

Antikroppsstatus mot kattpest hos lejonen i Kolmårdens Djurpark

Karin Ohlson

Handledare: Tommy Linné
Inst. för molekylär biovetenskap

Biträdande handledare: Bengt Röken
Kolmårdens Djurpark

Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och
husdjursvetenskap
Veterinärprogrammet

Examensarbete 2006:15
ISSN 1652-8697
Uppsala 2006

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

INLEDNING.....	2
SAMMANFATTNING	3
BAKGRUND	4
Kolmårdens lejon	4
Vaccinationsrutiner.....	4
Utbrott av kattpest bland lejonen i Kolmården	4
Felint panleukopenivirus (FPV)	5
Parvovirus hos lejon	7
Vaccination	7
MATERIAL OCH METODER	10
RESULTAT	12
Antikroppstiter efter vaccination.....	12
Grupp 1: Antikroppstiter efter en vaccination.....	12
Grupp 2: Antikroppstiter efter två vaccinationer	13
Grupp 3: Antikroppstiter efter tre vaccinationer	15
Grupp 4: Antikroppstiter efter olika vaccinationsprogram	17
Antikroppstiter efter vaccination vid olika åldrar	19
Grupp 5: Antikroppstiter efter kattpestutbrottet 1994	20
DISKUSSION	22
SUMMARY	26
REFERENSER.....	27

INLEDNING

Kattpest orsakad av infektion med kattens parvovirus (Felint panleukopenivirus) är en sjukdom som i Sverige kontrolleras genom vaccination. Sjukdomen kan drabba alla kattdjur. Kattdjur i djurparker vaccineras mot kattpest med ett vaccin som egentligen är utvecklat för att användas på tamkatt.

På Kolmårdens Djurpark har man sedan ett antal år regelmässigt vaccinerat lejonerna och samlat sera från dem. Genom att analysera dessa sera med avseende på antikroppar mot kattpestvirus samt följa journaldata över vaccinationer finns möjlighet att svara på följande frågor:

1. Finns antikroppar mot kattpest hos ovaccinerade djur? Detta skulle tyda på en exponering utan sjukdom som följd, vilket är intressant då djurparken hade ett utbrott av kattpest bland lejonerna 1994.
2. Skiljer sig antikroppstitern hos djur som varit sjuka i kattpest från den hos djur som är vaccinerade?
3. Är en dos kattpestvaccin tillräckligt för att ett lejon ska utveckla ett antikroppssvar?
4. Vid vilken ålder bör man vaccinera ett lejon för att det ska utveckla ett antikroppssvar?
5. Hur ofta bör man vaccinera?

Två olika serummaterial undersöktes: dels sera samlade från 1988 till 2005 och dels sera från en pågående vaccination av två nyfödda kullar av lejonungar. Metoden som har använts för att mäta antikroppstitern är en ImmunoPeroxidase Monolayer Assay (IPMA).

Målet med denna undersökning är att följa antikroppstitern som följd av vaccination och på så sätt få underlag för att kunna ge ett förslag på hur ett vaccinationsprogram för lejon skulle kunna se ut.

SAMMANFATTNING

Lejonen i Kolmårdens Djurpark insjuknade 1994 i en infektionssjukdom som kunde diagnosticeras som kattpest. Sedan slutet av 1990-talet vaccineras parkens lejon mot sjukdomen med vaccinet Nobivac Tricat från Intervet. En studie på serumprover från lejonen har utförts. Proverna var tagna 1988-2005. Sera analyserades med avseende på antikroppar mot Felint Panleukopenivirus med en ImmunoPeroxidase Monolayer Assay (IPMA).

Lejonen delades in i grupper enligt följande: I Grupp 1, 2 och 3 placerades 40 lejon som vaccinerats mot kattpest en, två respektive tre gånger. Grupp 4 bestod av två kullar lejonungar (sex individer) som vaccinerades på två olika sätt under våren 2005 för att se hur och om antikroppssvaret varierade mellan de olika vaccinationssätten. Grupp 5 bestod av tolv lejon som levde under kattpestutbrottet 1994.

Lejonen hade utvecklat varierande antikroppstitrar. De lejon som levde under kattpestutbrottet hade mycket högre titrar än de djur som var vaccinerade. Antikroppstitrarna efter infektion låg hos några individer kvar i minst åtta år efter infektionen. De lejon som vaccinerats vid en ålder av 23 v. eller mer visade högre antikroppstitrer än lejon vaccinerade vid tidigare ålder. Maternella antikroppar hos unga djur kan vara en orsak till sämre antikroppssvar hos yngre djur. En dos kattvaccin verkar vara tillräckligt för att merparten av lejonen ska få en antikroppstitrer på 1/90 eller högre. För att man ska få en god effekt av vaccineringen föreslås att lejonen vaccineras vid en ålder av minst 23 v. Några individer har visat positiv antikroppstitrer efter vaccination fyra år efter vaccinationen.

BAKGRUND

Kolmårdens lejon

Lejonen i Kolmårdens Djurpark lever tillsammans i en flock bestående av varierande antal djur. Flockens sammansättning har sett olika ut under årens lopp men generellt försöker man efterlikna hur lejonen väljer att leva i vilt tillstånd. En grupp honor som ofta är släkt med varandra lever med en eller flera hanar som är släkt med varandra men inte med honorna. Lejonen i Kolmården vistas i sarariparkens lejonavdelning, som utgörs av ett lejonstall och en två hektar stor frianläggning. Lejonen är inomhus på nätterna, och utomhus under dagtid året runt.

Idag består flocken av sex hanar som är födda i Borås (alla är efter samma hane men de har tre olika mödrar) och fyra honor som är födda i Kolmården (efter samma hane men med två olika mödrar). Dessutom finns sex lejonungar, varav hälften är födda i oktober 2004 och hälften i december 2004.

Vaccinationsrutiner

Redan på 80-talet vaccinerades en del av lejonen mot kattpest. År 1998 började vaccination ske regelmässigt. Lejonen vaccineras en, två eller ibland tre gånger med levande vaccin, Nobivac Tricat från Intervet, som förutom kattpestkomponenten även innehåller komponenter mot kattsnuva (Feline Rhinotracheitvirus, FRV, och Feline Calicivirus, FCV). Lejonen får i allmänhet en kattdos (1 ml) var, men i vissa fall har de fått en halv eller två tredjedels dos.

För de prover som ingår i detta examensarbete kunde följande data noteras: 51 av de 76 lejonen hade vaccinerats (67 %). Av dessa hade 18 vaccinerats en gång, 18 två gånger och 15 tre gånger. Åldern vid första vaccinationen varierade mellan sju v. och tio månader och tiden till andra vaccinationen varierade mellan fyra v. och elva månader. De lejon som fick en tredje dos fick denna en till 13 månader efter den andra dosen.

Utbrott av kattpest bland lejonen i Kolmården

Den 15 november 1994 insjuknade tre lejon, varav två hanar (ett respektive fem år gamla), och en hona (ett år), akut. Symtomen hos dessa lejon var rödbrun, vattnig och illaluktande diarré samt kräkningar, salivering och kraftigt nedsatt allmäntillstånd. Ett lejon hade även ataxi. Inget av lejonen hade vaccinerats mot kattpest. Lejonen sövdes för att kunna undersökas närmare och behandlas. Honan avled under narkosen. De övriga lejonen behandlades med vätska, antibiotika (Baytril vet), vitaminer (Beviplex vet och Tokosel vet) samt kortison (Prednisolon). Antibiotikabehandlingen följdes upp de närmaste dagarna. Blodprov som togs ut från ettårshanan och femårshanan visade på kraftig leukopeni. Femårshanan avled fem dagar efter insjuknandet. Då han obducerades i djurparken gjordes bland annat följande fynd: nekrotiserande enterit, pancreasnekroser och kraftig dehydrering. Prover skickades till SVA för patologanatomisk diagnos (PAD). Dessa prover konfirmerade fynden från obduktionen på Kolmården. En immunohistokemisk undersökning av tarmen gjordes också med avseende på parvovirus, och denna var positiv.

Honan som avled under narkosen obducerades på SVA. Obduktionen visade på akut hemorragisk enterit och även hos detta lejon kunde parvovirus påvisas med immunohistokemi. Ettårshanan tillfrisknade efter sjukdomen. Omkring en vecka efter insjuknandet hade diarrén upphört och allmäntillståndet hade förbättrats. Blodprov som togs skickades för analys av antikroppar mot kattpest till SVA. Titern var $\geq 1:1250$.

Under sjukdomstiden skiljdes djuren av till egna burar. De andra lejonerna vistades dock i samma hus hela tiden. Inget av de andra kattdjuren i djurparken insjuknade. Försök gjordes att ta reda på var smittan kommit från, bland annat provtogs djurparkens samtliga 10 huskatter. Ingen av dem hade en titer som var högre än 1:50. Prov togs även från tigrarna närmaste tiden efter att lejonerna varit sjuka, men de hade mycket låga titrar varför det ansågs osannolikt att de smittats. Serumprover tagna före utbrottet från åtta lejon (av vilka två var ovaccinerade och sex vaccinerade), varav ett senare insjuknade, visade låga titrar.

Sammanfattningsvis kan sägas att ett fåtal djur insjuknade trots att djuren vistades i samma byggnad. Djuren som blev sjuka fick symptom från gastrointestinalkanalen och CNS, samt nedsatt allmäntillstånd. Antikroppstitrarna hos de sjuka lejonerna var höga ($\geq 1/1250$). Immunohistokemisk undersökning påvisade parvovirus hos två individer.

Felint panleukopenivirus (FPV)

Feline panleukopenivirus orsakar sjukdomen kattpest (*eng Feline Panleukopenia*), som är allvarlig och i svåra fall ofta leder till döden om djuret inte får understödjande behandling. Infektionen ses oftast hos kattungar, men individer i alla åldrar kan drabbas. Idag vaccineras de flesta katter i Sverige och sjukdomen är ovanlig här. Ansamlingar av ovaccinerade katter ökar dock risken för utbrott.

Klassificering

Viruset tillhör familjen *Parvoviridae*, som består av två underfamiljer, *Parvovirinae* och *Densovirinae*, varav den senare endast innehåller insektsvirus. Underfamiljen *Parvovirinae* i sin tur består av fem genera: genus *Parvovirus*, dit FPV hör, samt genera *Erythrovirus*, *Amdovirus*, *Bocavirus* och *Dependovirus*. Tillsammans med FPV ingår i gruppen *Parvovirus* en mängd olika virus som alla infekterar sitt speciella djurslag, såsom canine parvovirus, porcine parvovirus och bovine parvovirus (11).

Parvovirus

Viruspartikeln har en diameter av 25 nm och visar icosahedral symmetri. Genomet består av en molekylenkelsträngat DNA (11). Parvovirus saknar hölje, vilket gör dem mycket resistent för påverkan från omgivningen. Virus kan överleva i månader till år i miljön (5), och de är mycket resistent mot olika desinfektionsmedel, pH-varianter och hetta (11). Virus replikeras i delande celler hos värden, då de kräver sen S-fas eller tidig G2-fas för att kunna replikera. Dessa krav innebär att virus dras till vävnader med snabbt delande celler. Det betyder också att fler vävnader drabbas hos unga djur än hos vuxna, då det ju är större aktivitet bland cellerna hos växande djur. Virusreplikationen sker i cellkärnorna (11). Kattdjur kan även infekteras av hundens parvovirus (CPV-2a

och CPV-2b). Det finns uppgifter om att ca 5 % av parvovirusinfektionerna hos katt orsakas av hundens parvovirus (15).

Smitta och patogenes

Kattpest är mycket smittsamt. Katten smittas via direktkontakt med infekterade djur eller från virus i miljön via t ex kläder och skor (5, 6). Virus utsöndras framför allt i kräkningar och avföring från smittade djur, men kan i akut stadium även utsöndras i saliv och urin (11). Första virusreplikationen sker i lymfoid vävnad i farynx, varifrån virus sedan sprids i kroppen via blodet (11). Leukocyter i blodet, tymus, benmärg, lymfknutor, mjälte och Peyerska plaque infekteras och dör, vilket orsakar en kraftig leukopeni redan vid sjukdomens början (11). Alla typer av leukocyter drabbas, liksom trombocyterna. Andra celler som delar sig fort och därför är känsliga för virus är epitelceller i tunntarmen, framför allt cellerna i Lieberkühns kryptor (11). Detta gör att villitopparna inte fylls på med nya celler, villi blir allt lägre och mindre funktionella och katten får diarré (11).

Symtom på kattpest

Sjukdomen kan vara subklinisk till perakut (6). Inkubationstiden är 2-10 dagar (11). Närmare 100 % av ovaccinerade katter i en population smittas, men i många fall är sjukdomen mild eller subklinisk (8). De första tecknen på akut sjukdom är att katten är slö, ovillig att äta, och törstig men ovillig att dricka (6). Därefter ses kräkningar och kraftig blodig diarré. Som följd av detta blir katten kraftigt dehydrerad (11). Mortaliteten är hög vid akut sjukdom (6). De flesta dödsfall sker inom 3-5 dagar efter att symtomen börjat, och orsakerna till dödsfall kan vara sekundär bakterieinfektion, dehydrering och elektrolytrubbning (6). Den perakuta formen drabbar framför allt ovaccinerade katter, oftast kattungar. Dessa katter får kraftigt nedsatt allmäntillstånd, låg kroppstemperatur och dör inom några timmar. Denna form kan förväxlas med förgiftningar (12). En mild form förekommer också, då katterna får lindrigt nedsatt allmäntillstånd och diarré i några dagar. I sällsynta fall får katten kronisk diarré till följd av skador som viruset orsakat tarmepitelet (12). Katter som infekteras intrauterint ett par v. innan födseln eller strax efter födseln kan utveckla cerebellär hypoplasi, med rörelsestörningar som följd (6). Dessa yttrar sig som ataxi, hypermetri och intentionstremor (6). En katt med cerebellär hypoplasi har symtom som kvarstår hela livet (6).

Diagnos

Anamnes, kliniska symptom och blodprov som visar leukopeni är vägledande för att ställa diagnosen kattpest. För att konfirmera diagnosen kan olika snabbtest för parvovirus i avföringen användas. Avföringsprov kan även skickas till SVA för analys av närvaro av parvovirus. Det går även att analysera antikroppar mot kattpest, då helst parprov (ett prov från början av sjukdomstiden och ett prov 10-14 dagar senare).

Immunitet

Efter genomgången sjukdom blir huskatter immuna under lång tid, sannolikt hela livet (15).

Parvovirus hos lejon

Feline panleukopenivirus isolerades första gången hos lejon 1973 (15). Man har på senare tid sett att lejon kan drabbas av hundens parvovirus (CPV-2a och CPV-2b) i större utsträckning än katter (15). Kattpest förekommer hos vilda lejon. I en studie som gjordes i Krügerparken i Sydafrika 1984-1991 hade 84 % av lejonerna antikroppar mot FPV (9). Det verkar dock vara skillnad i olika parker, då lejonerna i Etosha, Namibia, alla var negativa för FPV i samma studie.

Vaccination

Ett optimalt vaccin bör ha följande egenskaper (5, 16):

- ge bra skydd mot sjukdom
- ge bra effekt hos de flesta individer som behandlas
- ge bra immunologiskt minne, dvs varaktigt skydd mot sjukdom
- vara säkert (dvs inte orsaka bieffekter och inte vara farligt i sig)
- vara prisvärt
- det är en fördel om det går att skilja antikroppar som framkallats av vaccination från sådana som framkallats av genomgången infektion

Ett optimalt vaccin framkallar både Th1- och Th2-svar, alltså både cellmedierad och humoral immunitet (Caroline Fossum, pers medd, 2001). Det finns två typer av vaccin som är utvecklade mot kattpest, nämligen levande (attenuerade) och inaktiverade (7). En översikt över de kattvacciner mot kattpest som finns att tillgå i Sverige 2005 visas i Tabell 1.

Tabell 1. Vacciner tillgängliga mot kattpest i Sverige 2005 och deras spektrum

Märke	Typ av vaccin		Infektionsagens				
	Attenuerat	Inaktiverat	FPV	FRV	FCV	FeLV	Chlamydia psittaci
Felocell CVR (Orion)	X		X	X	X		
Nobivac Tricat (Intervet)	X		X	X	X		
Fevaxyn Pentofell (Ceva Vetpharma)		X	X	X	X	X	X

FPV = Felint Panleukopenivirus, FRV = Felint Rhinotracheitvirus, FCV = Felint Calicivirus, FeLV = Felint leukemivirus.

Attenuerade vaccin

I levande vacciner utgörs antigenet av levande attenuerade mikroorganismer. Dessa kan replikera i värden och inducera interferonproduktion, vilket kan ge bättre immunitet än vacciner med avdödade mikroorganismer (16). Andra fördelar

med levande vacciner är att de ger tidigt immunsvär och att de ger både humoralt och cellmedierat immunsvär (16). Levande vaccin ställer särskilda krav på tillverkning, hantering och lagring och det finns ökad risk för kontamination av vaccinet (16). Attenuerade levande vaccin kan orsaka sjukdom om de återgår till virulent form och de kan orsaka abort om dräktiga djur behandlas. Immunosupprimerade individer kan bli sjuka av vaccinationen (16). Det attenuerade levande vaccinet ger ofta livslång immunitet (16). Vid vaccination med levande vaccin räcker det ofta med en dos, eftersom mikroorganismerna finns kvar en tid och booster djuret, vilket leder till att ett sekundärt svar fås (se nedan) (5).

Inaktiverade vaccin

Inaktiverade vaccin innehåller döda mikroorganismer, som alltså inte kan föröka sig efter att ha injicerats i det vaccinerade djuret (13). Avdödade vacciner kan inte replikera eller övergå i virulent form, och de är mer lättlagrade (16). Nackdelarna kan vara att de ger relativt svagt immunologiskt svar och ofta krävs flera immuniseringar för att skyddande immunitet ska uppnås (16). Adjuvans är nödvändigt och det finns en större risk för lokal inflammation, systemisk biverkan och hypersensitivitet (16).

Immunförsvarets reaktion på en vaccination

Beroende på vilket agens som kommit in i kroppen aktiveras antingen Th1- eller Th2-lymfocyter. Antigen som agerar intracellulärt, t ex virus, aktiverar främst Th1-celler medan fria antigen såsom extracellulära bakterier främst aktiverar Th2-celler (13). Vilken typ av celler som aktiveras får betydelse för det fortsatta skeendet i immunreaktionen. Vid Th1-aktivering är det främst cellmedierat immunsvär som sätts igång (cytotoxiska celler och inflammation stimuleras) och vid Th2-aktivering fås ett humoralt immunsvär (B-celler stimuleras, vilka senare producerar antikroppar) (13). Attenuerade vaccin stimulerar i högre grad Th1-aktivering än inaktiverade vaccin. För att inaktiverade vaccin ska ge Th1-aktivering krävs ofta att ett adjuvans tillsätts (16). Vissa adjuvans medför en depå-effekt, som gör att antigenet ligger kvar längre så att fler lymfocyter kan exponeras för det (13). De antikroppar som produceras då kroppen först möter ett smittämne är IgM, men när B-lymfocyterna mognar och prolifererar i närvaro av T-cells cytokiner switchar de över till t ex IgG-produktion. Detta kallas primärt antikroppssvar, och det tar ett par v. innan dessa antikroppar kan mätas i blodet (5, 13).

Vid en andra exponering för infektiösaämnet, eller om infektionen ligger kvar längre, fås ett sekundärt antikroppssvar. Denna gång finns minnesceller som snabbt kan se till att en stor mängd antikroppar kan produceras. Nu är det IgG som produceras redan från början. Efter att ha eliminerat antigenet ligger IgG kvar på en högre nivå under en längre tid efter det sekundära antikroppssvaret (5, 13).

Vaccin mot kattpest anses allmänt ha en god effekt (6). Faktorer som kan påverka individens immunsvär negativt vid vaccinationen är kvarvarande maternella antikroppar, medfödda eller förvärvade immunodefekter, samtidig sjukdom, immunosuppressiv medicinering och stress (6).

Användning av vaccin till annat djurslag än det är avsett för

Lejon i Kolmårdens djurpark vaccineras med levande vaccin som är avsett för katt. Intervet, som tillverkar det vaccin som används till lejon i Kolmården, har inte gjort några studier på hur vaccinet fungerar hos lejon eller andra större kattdjur. Enligt David Sutton, Intervet Holland, finns följande problematik med att vaccinera vilda djur (pers medd 2005): Ett vaccin som attenuerats för ett djurslag kan fungera annorlunda om det ges till ett annat djurslag. Det finns exempel på att vaccin kan framkalla sjukdom när det ges till ett djurslag det inte är avsett för, exempelvis har modifierat valpsjukevaccin visat sig vara patogent för vissa illerraser och röd panda. Geparder kan utveckla sjukdom när de vaccineras med modifierade vacciner mot felint calici- och herpesvirus. Man rekommenderar på Intervet att ett avdödat vaccin används till vilda kattdjur. Eftersom Nobivac Tricat är ett kombinationsvaccin har man flera agens att ta hänsyn till. Det finns inga undersökningar som visar hur lejon reagerar på de attenuerade virus som vaccinet består av. Troligtvis är panleukopeni-komponenten relativt säker, medan calici- och herpesviruskomponenterna skulle kunna framkalla sjukdom.

MATERIAL OCH METODER

I Kolmårdens djurpark finns serumprover från samtliga lejon som har levt i parken. Av dessa prover valdes ett antal ut för analys. Kriterier för att proverna skulle inkluderas var att det fanns tillräcklig mängd prov (0,5 ml), att provet var märkt med individens namn eller id-nummer och att provet kunde kopplas samman med ett individkort (individkort förs över alla parkens lejon och fungerar som journaler). Prover från 1984 och framåt inkluderades. Totalt valdes 182 serumprover ut från 76 lejon varav 43 var honor och 33 hanar. Lejonen var mellan fyra månader och 14 år då proverna togs. Antal prov från varje individ varierade mellan ett och åtta. Proverna transporterades i kylväska till institutionen för molekylär biovetenskap, avd för veterinärmedicinsk immunologi och virologi, Biomedicinskt Centrum, Uppsala, för analys. Metoden som användes för analys av antikroppar var ImmunoPeroxidase Monolayer Assay (IPMA), som i det här fallet mäter IgG-antikroppar mot kattpest i serum. Proverna var kodade under analysen och har analyserats förutsättningslöst.

IPMA – preparation av antigen på mikrotiterplattor

Till 18 stycken 96-håls mikrotiterplattor (Falcon) användes två flaskor (2 x 10⁷ celler/flaska) med *Felis Catus* Whole Fetus-celler (FCWF-celler), som trypsinerats och därefter suspenderats i 100 ml medium inkl 10 % foetalt kalvserum per flaska. 100 µl av cellblandningen tillsattes per brunn. Därefter tillsattes CPV-virus (Canine ParvoVirus), 50 µl av virusspädning 10⁻⁴ per brunn. Plattorna placerades i värmeskåp (37°C med 5 % CO₂) i tre dygn. Därefter hälldes all vätska av från plattorna, 150 µl fysiologisk koksaltlösning tillsattes varje brunn och hölls sedan av. Cellerna fixerades sedan med 99,5 % alkohol, 150 µl per brunn, under 60 minuter i +4°C. Alkoholen hälldes därefter av och slutligen tillsattes 100 µl glycerol spädd 1:2 i PBS (fosfatbuffrad koksaltlösning) till varje brunn, varefter plattorna förvarades i frys (-20°C).

Analys av prover

Serumproverna tinades i rumstemperatur och numrerades. Nittiosex-hålsplattorna med infekterade och fixerade FCWF-celler togs ur frysen och glycerolblandningen hölls av. Plattorna tvättades en gång med NaCl (0,9 %). En blandning av PBS-tween (fosfatbuffrad koksalttvättlösning) och skummjölkpulver (5 %) tillsattes alla brunnar, 135 µl till översta raden och 100 µl till övriga brunnar. Därefter tillsattes 15 µl serumprov till de översta brunnarna, varefter provet blandades med pipett och titrerades ut i 3-stegsspädning genom att 50 µl flyttades till brunnen nedanför. Från sista brunnen togs 50 µl bort så det fanns lika stor mängd i alla brunnar. Efter att ha inkuberats i rumstemperatur i en timme tvättades plattorna 3 gånger med PBS-tween. Därefter tillsattes 100 µl konjugat spädd 1:1000 i PBS-tween med skummjolk (5 %) till alla brunnar. Konjugatet som användes var Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Cat IgG (H+L) från Jackson ImmunoResearch laboratories. Plattorna inkuberades en timme i rumstemperatur, och tvättades därefter 3 gånger i PBS-tween.

Infärgning gjordes med en infärgningslösning bestående av 5 ml natriumacetatbuffert, 6 µl 3 % H₂O₂ och 300 µl 3-amino-9-etylkarbasol-n,n-dimetylformamid per platta. Ingredienserna i färglösningen blandades till i nämnd ordning just innan lösningen skulle användas. Av lösningen tillsattes 50 µl per

brunn, och plattorna inkuberades 20 minuter i rumstemperatur. Därefter hälldes lösningen av och 50 µl PBS-tween tillsattes varje brunn. Plattorna avlästes i mikroskop. Brunnen bedömdes som positiv då en tydlig rödaktig infärgning av cellkärnorna kunde ses. Att IPMA-analysen avläses manuellt i mikroskop innebär att olika avläsare kan påverka resultatet. Under denna IPMA-analys lästes proverna av författaren, samt av en erfaren laboratorieassistent. Provsvarerna som erhöles var i flertalet fall desamma. Som kontroll för reproducerbarheten av IPMA:n kördes 32 prover två gånger. Av dessa visade 50 % (14) samma resultat båda gångerna, 34 % (11) skiljde sig ett titersteg upp eller ner och 16 % (5) skiljde sig mer än ett titersteg. IPMA enligt detta protokoll har utarbetats för mätning av antikroppstiter mot hundparvovirus i hundsera efter vaccination med god reproducerbarhet och i överensstämmelse med andra diagnostiska metoder (Gunilla Blomquist och Maud Söderberg, SVA, pers medd. 2005).

RESULTAT

Antikroppstiter efter vaccination

Resultatet av analys av serumprover från 40 djur redovisas nedan. Lejon vaccinerade med Nobivac Tricat från Intervet (www.intervet.se) har inkluderats. Lejonen har vaccinerats en, två eller tre gånger. Serummaterialet delades därför upp i grupper: Serum från lejon som vaccinerats en, två och tre gånger placerades i Grupp 1, 2 respektive 3. I Grupp 4 placerades serum från två kullar med lejonungar som vaccinerats på två olika sätt under våren 2005.

Blodprov har tagits från lejonen i samband med att de sövts av någon orsak, exempelvis vid id-märkning. Då detta har skett vid olika tidpunkt för olika lejon är proverna tagna efter varierande tid från de vaccinationer som utförts. Även vaccinationerna är utförda vid olika åldrar av samma anledning.

Tabellerna och diagrammen visar dels när vaccinationer och provtagningar skett och dels vilka provsvar som erhållits. Titer anges som $1/y$ (logaritmisk skala på y-axeln). Observera att värdet för titer $<1/10$ representeras av stapel utan siffra (värdet $<1/10$ är inget exakt värde och kan därför inte visas i diagrammet).

Negativ kontroll

Som negativ kontroll användes 27 prover som tagits från lejon födda efter 1994 och före vaccination. Fyra av proverna hade en titer på $1/30$. Av dessa kom två prover från unga lejon (16 resp 23 v. gamla) och två från vuxna lejon.

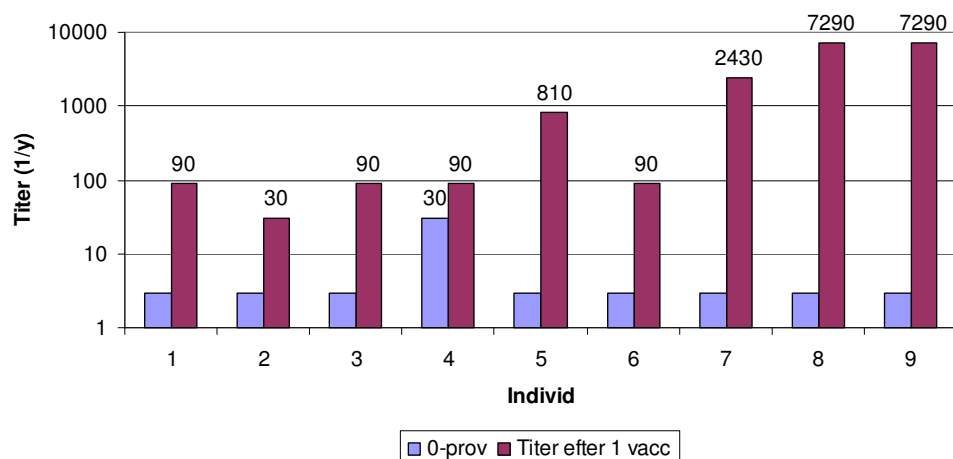
Positiv titer

Ett fåtal av proverna i den negativa kontrollen visade en titer på $1/30$. För att undvika att mätmetodsvariationer bidrar till att se falskt positiva prov så sattes en titer på $1/90$ som positiv.

Grupp 1: Antikroppstiter efter en vaccination

Nio av lejonen hade vaccinerats en gång. Dessa lejon var mellan sex och tio månader vid vaccinationstillfället och de vägde då mellan 28 och 58 kg. Samtliga fick en dos Nobivac Tricat. Vaccinationerna skedde under 1998-2000. Blodprovet som visar antikroppstiter efter vaccination togs varierande tid efter injektionen. Ålder vid vaccination och provtagning kan utläsas ur Tabell 2.

Lejonen i Grupp 1 har två olika honor som mödrar. Blodprov från modern till individ 1, 2 och 3 finns inte analyserat i denna studie. Hon hörde dock till lejonen som levde under kattpestutbrottet 1994. Även modern till individ 4-9 levde under kattpestutbrottet och hon hade en antikroppstiter på $\geq 1/21870$ år 1996 och en titer på $1/2430$ år 2002. Ungarna föddes under 1998-1999. Antikroppstitrarna som erhållits efter analys av blodprov från lejonen i Grupp 1 visas i Figur 1.



Figur 1. Antikroppstiter hos lejon i Grupp 1 (observera att titer <1/10 representeras av stapel utan siffra)

Tabell 2. Tidpunkt för vaccination och blodprov hos lejon i Grupp 1

Individ	Ålder vid vacc	Ålder vid blodprov (ej 0-prov)
1	10 må	4 år 9 må
2	10 må	2 år 3 må
3	10 må	1 år 5 må
4	10 må	3 år 2 må
5	10 må	4 år 2 må
6	10 må	2 år 2 må
7	6 må	1 år 1 må
8	6 må	1 år 1 må
9	6 må	8 må

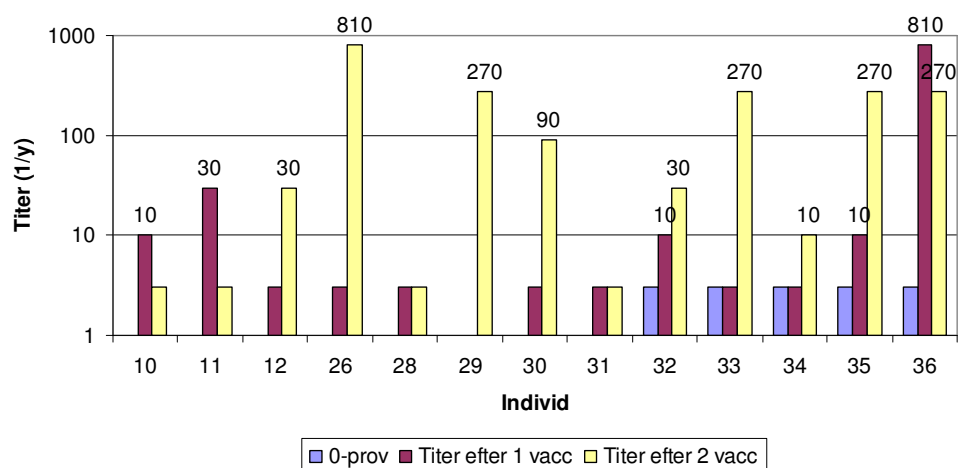
Alla lejon utom individ 2 har positiv antikroppstiter efter vaccination. Titrarna är höga trots att lång tid förflutit hos vissa individer sedan vaccinationen gavs. Individ 4 har antikroppstiter av 1/30 i 0-provet.

Grupp 2: Antikroppstiter efter två vaccinationer

Tretton av lejonerna var vaccinerade två gånger. Vaccinationerna utfördes under åren 2000-2004. Dessa lejon vaccinerades första gången vid 8-14 v. ålder (se Tabell 3). Uppgifter om vikt vid första vaccinationen finns angivet i journalerna för några av lejonerna, de vägde då runt 8-9 kg. Revaccination skedde varierande tid efter första vaccinationen, vilket kan utläsas ur Tabell 3. Figur 2 visar vilka antikroppstitrar som erhållits efter analys av blodproven från lejonerna i denna grupp.

Individ 30 och 31 fick en halv dos Nobivac Tricat var vid första vaccinationstillfället, övriga gånger har alla individer fått en dos Nobivac Tricat var.

Enligt journalanteckningarna var individ 31 vinglig tre dagar efter första vaccinationen. Individ 33 behandlades på grund av ataxi tre veckor före första vaccinationen med kortison, antibiotika och B-vitaminer. Vid andra vaccinationen var hon fortfarande vinglig, och hade magrat av. Individ 34 visade tecken på ataxi vid andra vaccinationen. Övriga djur var friska i samband med vaccinationerna. Mödrarna till individ 30-36 hade inga påvisbara antikroppar vid provtagning som utfördes 2002. Modern till individ 10, 11, 12, 26, 28 och 29 levde under kattpestutbrottet 1994, men inget prov från detta djur har inkluderats i denna studie.



Figur 2. Antikroppstiter hos lejon i Grupp 2 (observera att titer <1/10 representeras av stapel utan siffra)

Tabell 3. Tidpunkt för vaccination och blodprov hos lejon i Grupp 2

Individ	Ålder vid vacc 1	Ålder vid vacc 2	Tidpunkt för första blodprovet (ej 0-prov)	Tidpunkt för andra blodprovet
10	10 v.	16 v.	vid vacc 2	2 år och 4 må efter vacc 2
11	10 v.	16 v.	vid vacc 2	2 år och 4 må efter vacc 2
12	10 v.	16 v.	vid vacc 2	1 år och 4 må efter vacc 2
26	10 v.	13 må	vid vacc 2	3 må efter vacc 2
28	10 v.	13 må	vid vacc 2	4 v. efter vacc 2
29	10 v.	13 må	-	3 v. efter vacc 2
30	14 v.	21 v.	vid vacc 2	11 må efter vacc 2
31	14 v.	21 v.	vid vacc 2	11 må efter vacc 2
32	10 v.	18 v.	vid vacc 2	6 må efter vacc 2
33	10 v.	18 v.	vid vacc 2	6 må efter vacc 2
34	10 v.	18 v.	vid vacc 2	6 må efter vacc 2
35	8 v.	16 v.	vid vacc 2	7 må efter vacc 2
36	8 v.	16 v.	vid vacc 2	7 må efter vacc 2

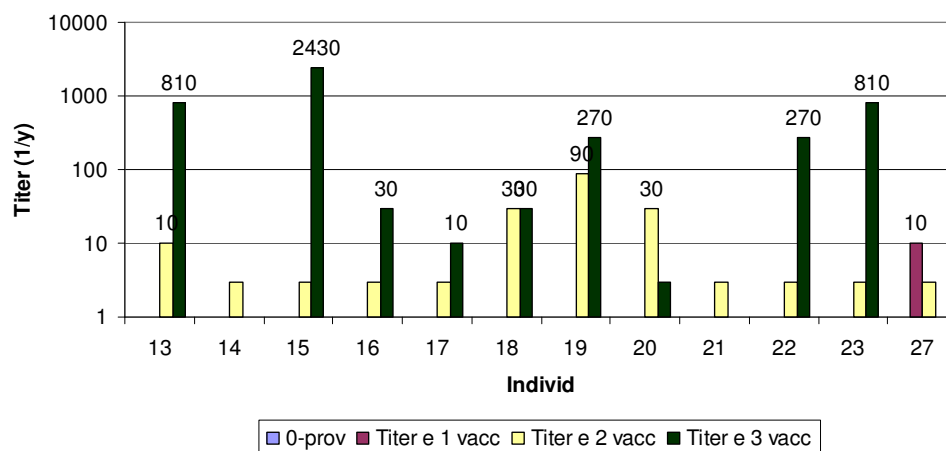
I Grupp 2 visar ett lejon, individ 36, positiv antikroppstiter efter en vaccination. Två av lejonerna som inte har någon påvisbar antikroppstiter efter första vaccinationen fick en halv dos vaccin (individ 30 och 31). Sex (46 %) av lejonerna (individ 26, 29, 30, 33, 35 och 36) har positiv antikroppstiter efter två vaccinationer. Av lejonerna som var äldre än 23 v. (individ 26, 28 och 29) vid vaccinationen har 67 % svarat, medan 40 % av lejonerna som var yngre än 23 veckor vid vaccinationen har svarat. Individ 31 och 33, som visade tecken på ataxi i samband med vaccinationerna, har inte utvecklat positiv antikroppstiter efter vaccination. Individ 34 har utvecklat en titer på 1/270 efter andra vaccinationen då han visade tecken på ataxi.

Grupp 3: Antikroppstiter efter tre vaccinationer

Tolv av lejonerna var vaccinerade 3 gånger. Dessa lejon var sju till tio v. vid första vaccinationen (se Tabell 4). Vikten vid den första vaccinationen är okänd. Vikten vid andra vaccinationen är känd för individ 27, som då vägde 78 kg. Alla lejon i den här gruppen utom nr 27 är födda i Borås Djurpark och de två första vaccinationerna utfördes där. De vägdes i samband med tredje vaccinationen och då varierade vikten mellan 96 och 103 kg. Vaccinationerna skedde under 2001-2002. Ålder vid vaccinationerna och tid till respektive provtagning visas i Tabell 4.

Individ 17, 18, 19, 20 och 23 fick 2/3 dos Nobivac Tricat vid 3:e vaccinationstillfället, övriga vaccinationer har skett med en dos Nobivac Tricat per individ. Individ 27 fick sin andra vaccindos i samband med att hon sövdes pga hälta. Hon fick antiinflammatorisk behandling i samband med vaccinationen. Övriga lejon har varit friska vid vaccinationerna.

För de lejon som kommer från Borås Djurpark (alla utom nr 27) är antikropsstatus hos moderdjuren okänt. Modern till individ 21, 22 och 23 vaccinerades tre år innan kullen föddes, medan mödrarna till de andra boråslejonerna är från Danmark med okänd vaccinationsstatus. Modern till nr 27 har också okänd antikropsstatus. Hon levde under kattpestutbrottet 1994. Resultaten av provtagningen visas i Figur 3.



Figur 3. Antikroppstiter hos lejon i Grupp 3 (observera att titer <1/10 representeras av stapel utan siffra)

Tabell 4. Tidpunkt för vaccination och blodprov hos lejon i Grupp 3

Individ	Ålder vid vacc 1	Ålder vid vacc 2	Ålder vid vacc 3	Tidpunkt för första blodprovet	Tidpunkt för andra blodprovet
13	8 v.	16 v.	18 må	vid 3:e vacc	5 må efter vacc 3
14	8 v.	16 v.	18 må	vid 3:e vacc	- 2 år 3 må efter vacc 3
15	8 v.	16 v.	18 må	vid 3:e vacc	vacc 3
16	7 v.	11 v.	16 må	vid 3:e vacc	1,5 år efter vacc 3
17	7 v.	11 v.	16 må	vid 3:e vacc	4 må efter vacc 3
18	7 v.	11 v.	16 må	vid 3:e vacc	3 må efter vacc 3
19	7 v.	11 v.	16 må	vid 3:e vacc	4 må efter vacc 3
20	7 v.	11 v.	16 må	vid 3:e vacc	4 må efter vacc 3
21	7 v.	11 v.	15 må	vid 3:e vacc	-
22	7 v.	11 v.	15 må	vid 3:e vacc	11 må efter vacc 3
23	7 v.	11 v.	15 må	vid 3:e vacc	4 må efter vacc 3
27	10 v.	19 v.	13 må	vid 2:a vacc	vid 3:e vacc

Ett lejon (individ 19) har positiv titer efter två vaccinationer. Efter tre vaccinationer visar fem lejon (56 %) positiv antikroppstiter (individ 13, 15, 19, 22 och 23). Fyra individer (16, 17, 18 och 20) har inte svarat på vaccinationerna. Prov efter tredje vaccinationen saknas från tre individer. Två (individ 19 och 23) av fem lejon (40 %) som fått 2/3 dos vid tredje vaccinationen har utvecklat positiv antikroppstiter (minst 1/90). Av de sju lejon som fått en full dos finns uppföljande prov från fyra, och av dessa har tre (75 %) utvecklat positiv titer. Individ 27, som behandlades för hälsa i samband med andra vaccinationen, har inte utvecklat positiv antikroppstiter efter denna vaccination.

Hur länge ligger antikropparna kvar efter vaccination?

Några av lejon, individ 1, 4 och 5 (Grupp 1) och individ 13 och 15 (Grupp 2), som utvecklat antikroppar efter vaccination har provtagits lång tid efter vaccinationen, vilket kan utläsas ur Tabell 5. Relativt höga titrar finns kvar 2-4 år efter vaccination. Observera att detta blodprov inte alltid är detsamma som det som redovisas i respektive grupp ovan, då denna tabell utgörs av provtagning som skett så långt efter vaccinationen som möjligt medan resultaten ovan visar prover som tagits närmast efter vaccinationen.

Tabell 5. Duration av antikroppstiter efter vaccination

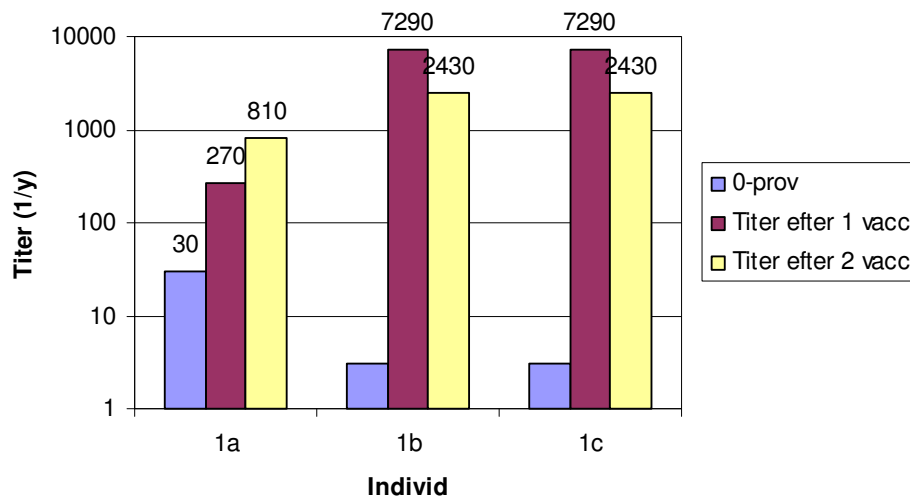
Individ	Tid mellan vaccination och provtagning	Titer
1	4 år	1/90
4	4 år 2 må	1/270
5	3 år 6 må	1/810
13	2 år 3 må	1/270
15	2 år 4 må	1/810

Grupp 4: Antikroppstiter efter olika vaccinationsprogram

Två kullar lejon föddes i Kolmården under hösten 2004, en i oktober och en i december. Ungarna vaccinerades på två sätt under våren 2005, se nedan. Blodprov togs 3-4 gånger under vaccinationstiden. Resultatet från dessa provtagningar visas i Figur 4 och 5.

Oktoberkullen

Honan som i texten ovan har individnummer 27 (tillhör Grupp 3) födde tre ungar den 16 oktober 2004. Hon vaccinerades senast 2002, blodprov för analys av antikroppstiter efter den vaccinationen saknas. Alla tre ungarna är hanar, här kallade 1a, 1b och 1c. När ungarna var 23 v. gamla fick de sin första vaccination, och den andra gavs två månader senare. Båda gångerna gavs en hel dos Nobivac Tricat. Vikten vid vaccinationerna varierade vid första vaccinationen mellan 19 och 24 kg och vid andra vaccinationen mellan 29,5 och 37 kg. Blodprov togs i samband med vaccinationerna samt en månad efter andra vaccinationen.



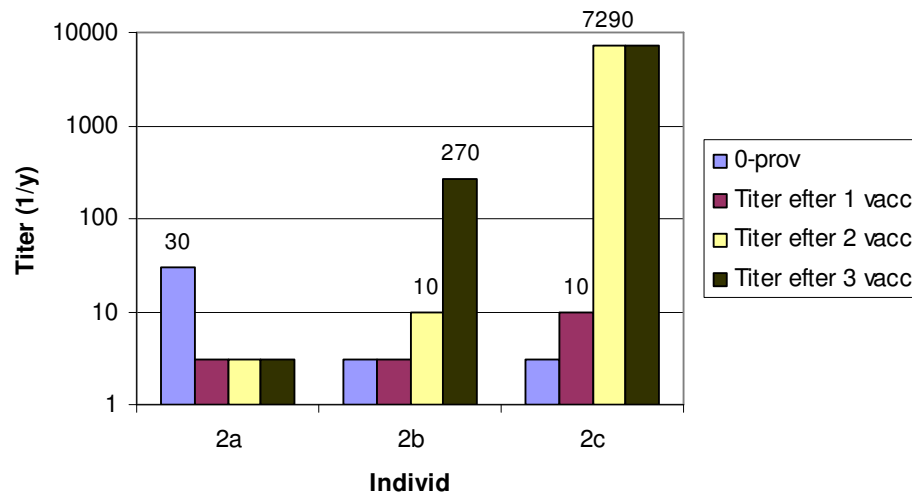
Figur 4. Antikroppstiter efter vaccination av oktoberkullen (observera att titer $< 1/10$ representeras av stapel utan siffra)

I oktoberkullen har en av ungarna (1a) en titer på $1/30$ före vaccinationen. Efter vaccinationerna har samtliga lejon svarat med titrar mellan $1/270$ och $1/7290$.

Decemberkullen

Modern till ungarna i denna kull har i texten ovan individnummer 26 (tillhör Grupp 2). Vid senaste provtagningen (som skedde i april 2005) hade honan en antikroppstiter på $1/810$, och hon vaccinerades senast 2002. Kullen, som föddes den 5 december, består av tre ungar (2a, 2b och 2c), varav två honor och en hane. Ungarna vaccinerades första gången vid 16 v. ålder, och sedan två gånger till med en månads mellanrum. De fick $2/3$ dos vaccin var vid varje tillfälle. De vägde vid första vaccinationen 11-12,5 kg, vid andra vaccinationen 14,7-17,4 kg och vid

tredje vaccinationen 20,5-23 kg. Blodprov togs från ungarna i samband med varje vaccination samt ca en månad efter tredje vaccinationen.

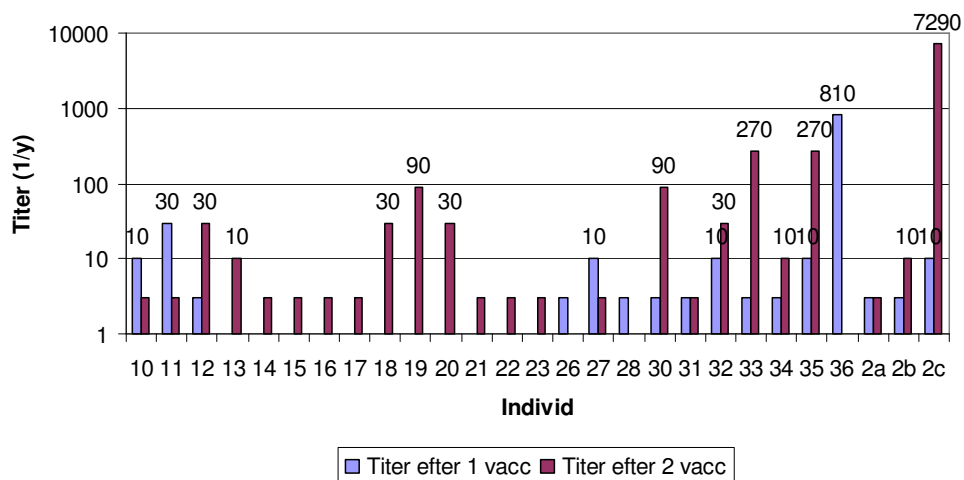


Figur 5. Antikroppstiter efter vaccination av decemberkullen (observera att titer <1/10 representeras av stapel utan siffra.)

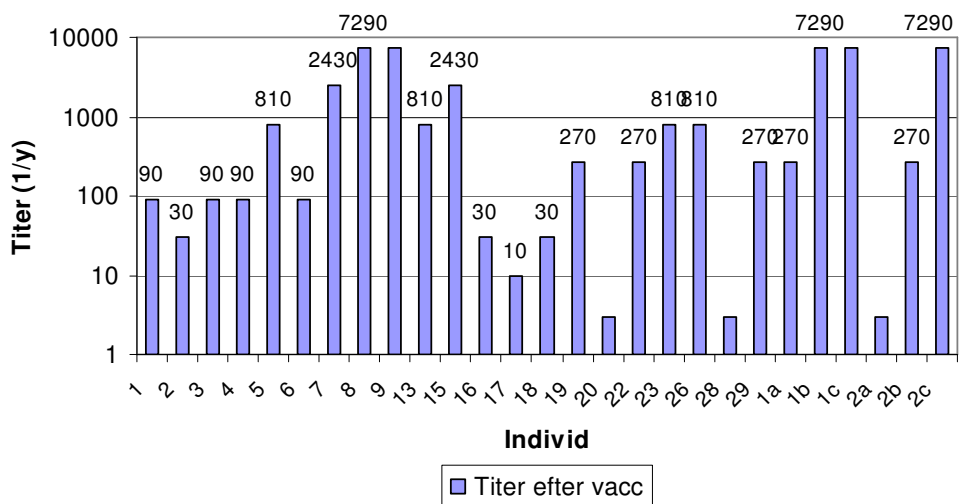
Ett av lejonerna (2a) har inte svarat vid något av vaccinationstillfällena. Två v. efter tredje vaccinationen sövdes hon på grund av att hon rörde sig vingligt och med höga benlyft samt hade abducerande armbågar. Varken palpation, blodprovsanalyser eller röntgen kunde visa några fynd som förklarade rörelsestörningarna. Lejonet behandlades med antibiotika, vitaminer och kortison, men blev inte bättre utan avlivades två v. senare. De andra två ungarna i decemberkullen har negativa antikroppstitrar efter en vaccination (<1/10 resp 1/10). Efter tredje vaccinationen har båda ungarna höga titrar.

Antikroppstiter efter vaccination vid olika åldrar

En sammanställning av antikroppstitrarna hos lejon vaccinerade före 23 och efter 23 v ålder visas i Figur 6 respektive 7. Vid en jämförelse ses generellt en högre antikroppstiter efter vaccination av lejon äldre än 23 v.



Figur 6. Antikroppstiter efter vaccinationer som utförts före 23 v. ålder (observera att titer <1/10 representeras av stapel utan siffra)



Figur 7. Antikroppstiter efter vaccinationer som utförts efter 23 v. ålder (observera att titer <1/10 representeras av stapel utan siffra)

Figur 6 visar antikroppstitrar efter vaccination utförda före 23 v ålder (40 st). Sex (15 %) av dessa vaccinationer gav positiv antikroppstiter.

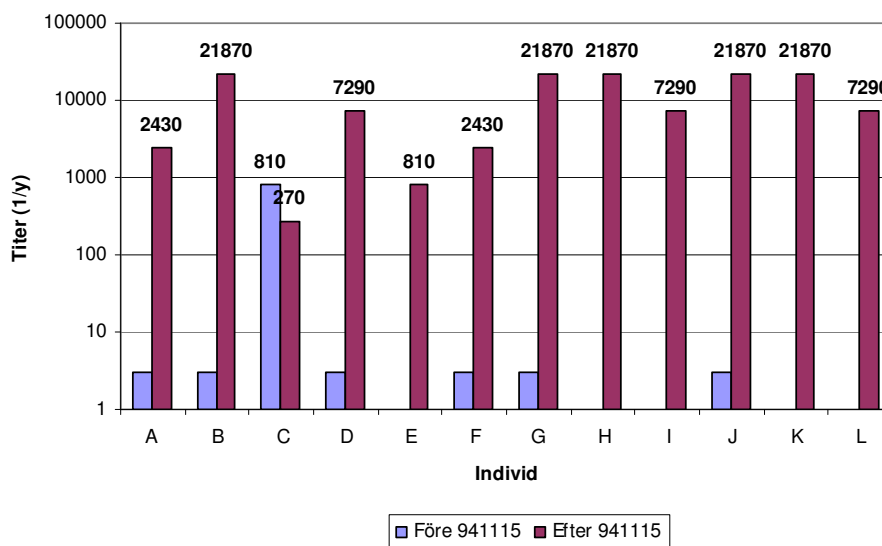
Figur 7 visar antikroppstitrar efter vaccinationer utförda efter 23 v ålder (27 st). Av dessa vaccinationer gav 20 stycken (74 %) positiv titer.

Grupp 5: Antikroppstiter efter kattpestutbrottet 1994

Blodprov har analyserats från tolv lejon som levde under kattpestutbrottet i november 1994. Av dessa lejon var ett kliniskt sjuka (individ K), se under Kolmårdens lejon och Diskussion. Övriga lejon har inte visat tecken på sjukdom. Sju av lejonerna (individ A, B, F, H, I, J och L) vaccinerades mot kattpest en gång under 1988 eller 1989. Det framgår inte i journalerna vilket vaccin som användes.

Av lejonerna i denna grupp föddes A-E 1988 och F-J samt L 1989. Individ K föddes 1993.

Antikroppstitrar från dessa lejon visas i Figur 8. Stapeln för titer efter utbrottet motsvarar det blodprov som tagits närmast efter utbrottet. Tiden till blodprovet varierar mellan djuren från tre veckor till åtta år efter utbrottet.



Figur 8. Antikroppstiter hos lejon som levde under kattpestutbrottet i november 1994 (observera att titer $<1/10$ representeras av stapel utan siffra och att värde 21870 egentligen motsvarar värde $\geq 1/21870$)

Från sju av lejonerna (A, B, C, D, F, G och J) finns 0-prov taget (ett prov taget någon gång före utbrottet). Med undantag för individ C är antikroppstiter hos dessa $<1/10$. Individ C importerades från England 1988. Han var då 6 månader gammal. Vid första blodprovet som togs från honom hade han varit i Sverige i knappt åtta månader. Provet visar en titer på $1/810$. Enligt journalen är han inte vaccinerad. Efter vad som kan utläsas ur journalen har han inte heller visat tecken på sjukdom varken i England eller Sverige. De prover som tagits från övriga lejon efter utbrottet visar i samtliga fall höga titrar. Fem av lejonerna har en titer på $\geq 1/21870$ och resten ligger på mellan $1/810$ och $1/7290$.

Hur länge ligger antikropparna kvar efter infektion?

Från flera av lejonerna som levde under kattpestutbrottet har upprepade provtagningar skett efter utbrottet. I Tabell 6 går att läsa hur antikroppstitrarna ligger flera år efter utbrottet. Flera av lejonerna har fortfarande höga titrar åtta år efter infektionen, trots att de inte visade sjukdomstecken.

Tabell 6. Antikroppstiter 1994-2002 (år 0 till 8) hos lejonerna som levde under kattpestutbrottet

Antal år efter utbrottet	Individ					
	A	B	C	D	E	F
0	-	$\geq 1/21870$	1/270	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-
2	1/2430	-	1/270	-	-	-
3	-	-	-	1/7290	-	-
4	-	-	-	-	-	1/2430
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	1/810	-	1/270	-	-	-
8	-	-	-	1/2430	1/810	-

Antal år efter utbrottet	Individ					
	G	H	I	J	K	L
0	-	-	-	-	$\geq 1/21870$	-
1	$\geq 1/21870$	$\geq 1/21870$	-	-	$\geq 1/21870$	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	$\geq 1/21870$	-	-	-	-
4	-	-	-	$\geq 1/21870$	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	-	-	1/7290	-	-	-
8	-	1/2430	-	-	-	1/7290

DISKUSSION

Denna studie omfattar sera samlade från 1988 till 2005. Antikroppstitern bestämdes i samtliga fall med IPMA. För att undvika mätmetodsvariationer och eftersom fyra av 27 prover i den negativa kontrollen hade en titer på 1/30 (varav två prover kom från lejon som var vuxna och därför inte kunde ha kvarstående maternella antikroppar), har gränsen för positiv reaktion satts till titer 1/90 i denna studie. Detta innebär att titer 1/10-1/30 tillhör en gråzon, där varken positiva eller negativa provsvar kan bedömas med säkerhet. Analysen utfördes på fixerade kattceller som infekterats med hundparvovirus. Eftersom antigenet som producerades i de infekterade cellerna var hundparvovirusproteiner fanns en osäkerhet om det kunde fungera som antigen för att upptäcka och titrera antikroppar mot det närbesläktade parvovirus hos katt. Titrering av proverna från lejon var möjlig vilket innebär att antigenet som producerades under analysen detekterade antikroppar mot parvovirus i lejonsera. Dessutom kunde de titrar som bestämts av SVA på sera från lejon under kattpestutbrottet konfirmeras med detta antigen. Det sekundära antiserat som användes var riktat mot kattserum. Förförsök, inte upptagna i denna studie, har visat att antikattserumet även reagerade mot lejonserum (Tommy Linné, SLU, pers medd. 2005).

För att få en uppfattning om graden av skyddande immunitet efter vaccination krävs en mätning av neutraliserande antikroppar, och eventuella challenge studier. Intervet har i sina studier bedömt en titer på 1/32 eller högre som skyddande (Jenny Sjökvist, Intervet AB, pers medd., 2005). I en annan studie där man använde hemagglutination inhibition vid analysen bedömdes en titer på minst 1/40 som skyddande (4). Med en liknande bedömning skulle de antikroppstitrar som uppnåddes efter vaccination av lejon i denna studie vara skyddande. Det kan emellertid vara svårt att säga hur hög titer lejonen i denna studie behöver ha för att antikropparna ska skydda mot infektion. Dels har en annan analys (IPMA) använts här än i studierna ovan, dels gäller det ett annat djurslag. Intressant är att ett lejon (individ C) som hade en titer på 1/810 vid utbrottet av kattpest i Kolmården 1994 inte insjuknade. De flesta vaccinationerna har gett en klar titerstegring hos de undersökta lejonen.

Hos hund varar immuniteten minst ett år efter vaccination mot parvovirus (1). Durationen beror på vilket vaccin som används och hur kraftig den initiala responsen är (1). I en studie som gjordes på huskatter såg man att antikropparna efter vaccination mot kattpest låg kvar i mer än sju år (14). Även här kan skillnader finnas mellan olika vacciner, varför varje vaccin måste utvärderas separat (2). Det är även svårt att veta hur det förhåller sig hos lejon, eftersom det som gäller för ett djurslag inte behöver gälla för ett annat. Några av lejonen i denna studie (Tabell 5, individ 1 och 4) visade en hög titer mer än fyra år efter vaccination vilket visar att en lång duration fås även hos lejon.

En skyddande immunitet består i de flesta fall både av ett antikroppsskydd och en cellförmedlad immunitet. Ett levande vaccin ger i allmänhet upphov till båda och det kan hända att ett skydd beroende på cellförmedlad immunitet finns även hos ett djur med låg antikroppstitr.

Vaccination av lejon i Grupp 1-3 har skett under lång tid och förmodligen med olika batcher av vaccin. Levande vaccin kan vara känsligare för temperaturväxlingar och kan påverkas under förvaring. Det är sålunda flera faktorer som kan påverka antikroppstitern och förklara att en förväntad titerökning kan ha uteblivit. Hos vissa lejon är det möjligt att närvaron av maternella antikroppar påverkat den egna antikroppsproduktionen. Hos huskatter har man sett att de maternella antikropparna försvinner gradvis och är nere på icke interfererande nivåer vid 8-14 v. ålder (3, 12). I en studie har man visat att endast 12 % av kattungar med maternella antikroppstitrar på mer än 1/10 svarade på vaccination mot kattpest (12). En del författare föreslår att man bör vaccinera katter en extra gång vid 16 v. ålder för att maximalt antikroppssvar ska uppnås (8, 12).

Lejon som inte varit helt friska eller utsatta för stor stress vid vaccinationstillfället kan ha svarat sämre på vaccination. Men även hos friska individer kan normalt antikroppssvar utebli. I en studie svarade 263 av 272 katter (96,7 %) med antikroppar mot kattpest efter vaccination, trots att alla katter behandlats likadant och var friska vid behandlingen (4). I en annan studie, där man undersökte antikroppssvar efter kattpestvaccination hos kattungar som saknade maternella antikroppar mot kattpest, såg man att 89 % av de vaccinerade kattungarna svarade på vaccinationen (12).

Några lejon visar en titer på 1/30 i 0-provet. Hos unga lejon kan de antikroppar som funnits i 0-provet vara maternella. Det är okänt hur länge maternella antikroppar ligger kvar hos lejon. Mindre troligt är att en naturlig infektion skulle vara orsaken till titern i 0-provet, då en naturlig infektion borde ge avsevärt högre titrar och drabba fler individer.

En del individer har fått en vaccinationsdos som är mindre än den dos som ges till katt. I Grupp 3 har 40 % av lejonen som fått 2/3 dos vaccin utvecklat positiv titer, medan 75 % av lejonen som fått full dos utvecklat positiv titer. I Grupp 4, där lejonungar vaccinerats på två olika sätt och med två olika doser, har titer på 1/7290 utvecklats i båda grupperna. Detta bör tala för att höga titrar kan uppnås oavsett vaccindos, men att det är större sannolikhet att fler lejon utvecklar antikroppstitrar om en mängd motsvarande 1 dos kattvaccin ges. När det gäller hundpopulationen, där hundarna får samma dos vaccin oavsett storlek, har man sett att vikten inte har någon betydelse för vilken antikroppstiter hunden utvecklar mot parvoviruset (10). Ett levande vaccin uppförökas i kroppen och stimulerar immunförsvaret, vilket sannolikt ger tillräcklig stimulans till immunförsvaret oavsett variation i storlek. Våra resultat visar att vuxna lejon som fått en dos kattvaccin i många fall har utvecklat höga antikroppstitrar mot viruset, vilket stödjer att det sannolikt förhåller sig på liknande sätt hos lejon.

Att ålder spelar roll för antikropsutvecklingen efter vaccination visas tydligt bland djuren i Grupp 2, där vaccination före 15 v. ålder gett en titerstegring hos endast ett av djuren. Efter en andra vaccination före eller efter 23 v. ålder visade 46 % respektive 67 % av djuren en titerstegring. Liknande resultat erhöles hos djur som vaccinerats vid tre tillfällen: Efter de första två vaccinationerna vid 7-19 v. ålder svarade endast en individ. Efter den tredje vaccinationen hade fem av nio (56 %) en positiv antikroppstiter. Att ålder är av betydelse betonas ytterligare hos

lejonen i Grupp 1, som vaccinerats en gång. De var alla mellan sex och tio månader vid vaccinationstillfället. Alla lejon utom individ 2 i denna grupp har utvecklat antikroppstitrar på 1/90 eller mer. De yngsta lejonen i denna grupp var 24 v. vid vaccinationstillfället vilket visar att ett bra antikroppssvar kan fås vid denna ålder. En sammanställning efter ålder vid vaccinationstillfället (Figur 6 och 7) visar att lejon äldre än 23 v. svarar bättre än yngre och slutsatsen blir att vaccination vid 23 v. eller äldre ger ett bra antikroppssvar och en förmodad immunitet mot kattpest.

I denna studie följdes även en grundvaccination av två lejonkullar födda under studiens gång. Djur som vaccinerades vid minst 23 v. ålder visade redan efter första vaccinationen en hög antikropptiter. Titeren var fortfarande hög efter andra vaccinationen, som gavs två månader efter den första. Kullen som vaccinerades vid 16 v. ålder, samt två gånger till med en månads mellanrum, visade ingen antikropptiter efter första vaccinationerna. Modern till dessa ungar hade 2002 en titer på 1/810. Två av ungarna svarade efter dos tre, som gavs då lejonen var 24 v. gamla, med en klar titerstegring. Den tredje ungen svarade inte på någon av vaccinationerna. Vaccindosen som getts skiljer sig mellan kullarna, men då det i båda fallen uppnått titrar på 1/7290 verkar skillnaden ha mindre betydelse. Motsvarande 2/3 till en kattedos kan vara fullt tillräcklig för att ge ett bra antikroppssvar hos lejon, förutsatt att den ges efter att de maternella antikropparna klingat av. De maternella antikropparna kan störa antikropsproduktionen efter vaccination även om de inte är tillräckligt många för att skydda djuret mot infektion. Djuret är därför extra känsligt för infektion i det fönster som bildas när de maternella antikropparna klingar av och innan djuret är helt immunokompetent. Studier har dock visat att kattungar kan börja bilda antikroppar efter vaccination mot kattpest redan vid 6 v. ålder (3).

Det bästa svaret på kattpestvaccinet har erhållits vid vaccination av lejon som varit 23 v. och äldre vid vaccinationstillfället. Vid denna ålder förmodas eventuella maternella antikroppar ha minskat och djurets förmåga till att bilda ett immunskydd bör ha ökat. Önskvärt är att vaccinationen sker tidigast vid 23 v. men vid misstanke om högt infektionstryck kan vaccin ges även tidigare. En booster senare kan i så fall vara motiverad för att uppnå en hög antikropptiter. Vid grundvaccination av vuxna katter kan det räcka med en dos för att få tillräckligt skydd (5). Detta bör gälla även för lejon. Denna studie visar att lejon som vaccineras efter 23 v. ålder oftare får ett bra antikroppssvar och i detta avspeglas ett förmodat skydd mot sjukdom. Lejon visar höga antikroppstitrar upp till fyra år efter vaccinationen, och baserat på dessa resultat borde en revaccination av lejonen inte krävas oftare än vart fjärde år.

Det vaccin som har använts för att vaccinera Kolmårdens lejon innehåller även komponenter mot Felint Rhinotrakeitvirus och Felint Calicivirus. Svar mot dessa komponenter har inte studerats här, varför andra vaccinationsrutiner kan krävas för att ett antikroppssvar mot dessa infektioner ska uppnås.

På Intervet rekommenderar man inte att levande vaccin ges till ett djurslag det inte är avsett för (se under Vaccination). Nobivac Tricat har använts till lejonen i parken, och även till lejon i andra parker, under flera år utan att djuren blivit sjuka

av vaccinet. Även om direkta studier saknas pekar detta på att vaccinet är fritt från generella biverkningar på grund av någon av de tre ingående komponenterna.

Serumprover från tolv lejon som levde under kattpestutbrottet 1994 har också analyserats, och av dessa har samtliga lejon som inte hade antikroppar före utbrottet utvecklat antikroppar mot sjukdomen med en titer på minst 1/810. Genomgången infektion har gett högre antikroppstitrar än vaccination och dessa ligger kvar på höga nivåer hos lejonerna länge efter utbrottet. Tre lejon som provtogs åtta år efter utbrottet hade fortfarande titrar på minst 1/810.

Av de lejon som levde under utbrottet har ett av elva lejon som serokonverterat visat tecken på sjukdom. Eftersom antikroppstitern är hög även hos övriga lejon som levde då innebär detta att majoriteten av lejon i Kolmården vid kattpestutbrottet 1994 genomgått en subklinisk infektion. Detta har också observerats hos huskatter (se under Felint Panleukopenivirus).

SUMMARY

The lions at Kolmårdens zoo are vaccinated against Feline Panleukopenivirus (FPV). In 1994 there was an outbreak among the lions at the zoo of FPV disease. A retrospective study has been made to measure the antibodytiters in vaccinated lions and lions that lived during the outbreak. An ImmunoPeroxidase Monolayer Assay (IPMA) was used to analyze the titers in the sera from the lions.

Lions were divided into five groups. Group 1, 2 and 3 contained lions vaccinated one, two and three times respectively (a total of 40 animals). The lions of Group 4 were born in 2004 (six lioncubs) and were vaccinated according to different regimes and the changes in antibodytiters were followed as response to vaccination during the spring 2005. Group 5 consisted of twelve lions that were alive during disease outbreak 1994. The antibody response post vaccination was dependent on the age of the lion at time of vaccination. Lions younger than 23 w. when vaccinated mounted a lower antibody response than the ones that were older than 23 w.

Lions that had been naturally infected had high titers, which still were high eight years after the outbreak. Lions tested as long as four years post vaccination still showed antibody titers towards FPV.

REFERENSER

1. Coyne, M. J. et al. 2001. Duration of immunity in dogs after vaccination or naturally acquired infection. *Vet rec.* (2001) 149, 509-515.
2. Coyne, M. J. et al. 2001. Duration of immunity in cats after vaccination or naturally acquired infection. *Vet rec.* (2001) 149, 545-548.
3. Dawson, S. et al. 2001. A field trial to assess the effect of vaccination against feline herpesvirus, feline calicivirus and feline panleucopenia virus in 6-week-old kittens. *Journ of Fel Med and Sur.* (2001) 3, 17-22.
4. Douglas, E. et al. 2004. Duration of serologic response to three viral antigens in cats. *J Am Vet Med Assoc.* 224(1), Jan 2004, 61-66.
5. Englund, L. et al. 2003. Vaccination av hund och katt i Sverige. SVA i samarbete med SVS.
6. Ettinger, S.J. et al. 2005. Textbook of Veterinary Internal Medicine, 6th ed. Elsevier. 612, 669-670.
7. Fass vet 2005
8. Gaskell, R. M. et al. 1996. Feline and Canine Infectious Diseases. Blackwell Science Ltd, Oxford. 29-37.
9. Hofmann-Lehmann, R. et al. 1996. Prevalence of antibodies to feline parvovirus, calicivirus, herpesviurs, coronaviurs and immunodeficiency virus and of feline leukaemia virus antigen and the interrelationship of these viral infections in free-ranging lions in east Africa. *Clin Diagn Lab Immunol.* Sept 1996, 554-562.
10. McCaw, D. L. et al. 1998. Serum distemper virus and parvovirus antibody titers among dogs brought to a veterinary hospital for revaccination. *J Am Vet Med Assoc.* 1998 Jul 1;213(1):72-5.
11. Murphy, F. A. et al., 1999. Veterinary Virology, 3d ed. Academic Press. 343-351.
12. Pedersen, N. C. 1991. Feline Husbandry. American Veterinary Publications, Inc. 183-186.
13. Roitt, I. et al. 2001. Immunology, 6th ed. Mosby. Kap 1, 2, 8, 17.
14. Scott, F. W. 1999. Long-term immunity in cats vaccinated with an inactivated trivalent vaccine. *Am J Vet Res.* 60 (5) Maj 1999, 652-658.
15. Steinell, A. et al. 2001. Parvovirusinfections in wild carnivores. *Journ of Wildl Dis.* 37(3), 2001, 594-607
16. Stridh, G. et al. 2003. Vacciner för hund och katt, del 1. *Svensk veterinärtidning.* 11 2003. 11-16.